

PCT/KR 98/ 00259

RO/KR 25.9.1998.

09/486392

REC'D 22 SEP 1998

WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

09/486392

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 1997년 특허출원 제42001호
Application Number

출원년월일 : 1997년 8월 28일
Date of Application

출원인 : 제일제당주식회사
Applicant(s)

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

8 6 27
199 년 월 일

특 허 청

COMMISSIONER





42001

방식심사란	당 당	심 사	일
	심 97.8.27. 부수		97.8.28 일



【서류명】 특허출원서

【수신처】 특허청장 귀하

【원서번호】 1

【제출일자】 1997.08.28

【발명의 국문명칭】 베포세포에 적응된 일본뇌염바이러스

【발명의 영문명칭】 Japanese Encephalitis virus strain adapted in vero cell

【출원인】

【국문명칭】 제일제당주식회사

【영문명칭】 CHEIL JEDANG CORPORATION

【대표자】 손경식

【출원인코드】 15002686

【출원인구분】 국내상법상법인

【전화번호】 07-726-8284

【우편번호】 100-095

【주소】 서울특별시 중구 남대문로5가 500번지 제일빌딩

【국적】 KR

【대리인】

【성명】 최학현

【대리인코드】 L137

【전화번호】 02-365-2727

【우편번호】 120-013

【주소】 서울특별시 서대문구 충정로3가 222

【대리인】

【성명】 황주영

【대리인코드】 S055



【전화번호】 02-365-2727

【우편번호】 120-013

【주소】 서울특별시 서대문구 충정로3가 222

【발명자】

【국문성명】 김현수

【영문성명】 KIM, Hyun Su

【주민등록번호】 460924-1058316

【우편번호】 134-766

【주소】 서울특별시 강동구 길2동 신동아아파트 32동 707호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 유왕돈

【영문성명】 YOO, Wang Don

【주민등록번호】 580126-1002318

【우편번호】 156-020

【주소】 서울특별시 동작구 대방동 대림아파트 108-1001

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 김수옥

【영문성명】 KIM, Soo Ok

【주민등록번호】 600501-2036228

【우편번호】 138-160

【주소】 서울특별시 송파구 가락동 프자아파트 10동 601호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 이성희

【영문성명】 LEE, Sung Hee

【주민등록번호】 610724-1163025

【우편번호】 442-372

【주소】 경기도 수원시 팔달구 매탄2동 한국아파트 102-808

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 문상범

【영문성명】 MOON, Sang Bum

【주민등록번호】 660906-1031014

【우편번호】 467-810

【주소】 경기도 이천시 마장면 덕평리 산 522-1

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 홍선표

【영문성명】 HONG, Sun Pyo

【주민등록번호】 680825-1026210

【우편번호】 449-840

【주소】 경기도 용인시 수지구 죽전리 339 대진아파트 106-502

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 신영철

【영문성명】 SHIN, Young Cheol

【주민등록번호】 680829-1482622

【우편번호】 137-761

【주소】 서울특별시 서초구 반포1동 상호가든아파트 2-809

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 정용주

【영문성명】 CHUNG, Yong Ju

【주민등록번호】 651112-1010427

【우편번호】 156-011

【주소】 서울특별시 동작구 신대방1동 현대아파트 104-1504

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 케네쓰 에이취. 엑켈스

【영문성명】 ECKELS, Kenneth H.

【주소】 미국 워싱턴 20307-5100 월터 리드 아미 인스티튜트 오브 리서취

【국적】 US

【발명자】

【국문성명】 브루스 인니스

【영문성명】 INNIS, Bruce

【주소】 미국 워싱턴 20307-5100 월터 리드 아미 인스티튜트 오브 리서취

【국적】 US

【발명자】

【국문성명】 조셉 알. 푸트낙

【영문성명】 PUTNAK, Joseph R.

【주소】 미국 워싱턴 20307-5100 월터 리드 아미 인스티튜트 오브 리서취

【국적】 US

【발명자】

【국문성명】 애숙 케이. 스리바스타바

【영문성명】 SRIVASTAVA, Ashok K.

【주소】 미국 워싱턴 20307-5100 월터 리드 아미 인스티튜트 오브 리서취

【국적】 US

【발명자】

【국문성명】 레오나르드 엔. 빈

【영문성명】 BINN, Leonard N.

【주소】 미국 워싱턴 20307-5100 월터 리드 아미 인스티튜트 오브 리서취

【국적】 US

【발명자】

【국문성명】 도리아 알. 듀보이스

【영문성명】 DUBOIS, Doria R.

【주소】 미국 워싱턴 20307-5100 월터 리드 아이 인스티튜트 오브 리서취

【국적】 US

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

최학현

(인)

대리인

황주명

(인)

【심사청구】 특허법 제60조의 규정에 의하여 위와 같이 출원심사를 청구합니다.

대리인

최학현

(인)

대리인

황주명

(인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 22,000 원

【가산출원료】 10 면 8,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 4 항 140,000 원

【합계】 170,000 원

【기타】 미생물기탁증(KFCC-10982) 사본 1통

【첨부서류】 1. 출원서 부분 2통

2. 요약서, 명세서 및 도면 각 3통

3. 위임장 1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 일본뇌염바이러스를 배로세포에서 계대배양하여 적응시킴을 특징
으로하여 일본뇌염백신의 제조에 탁월한 생산성 및 우수한 백신 효능을 나타내는
일본뇌염바이러스 변이주에 관한 것이다.

【명세서】

【발명의 명칭】

베로세포에 적응된 일본뇌염바이러스

(JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS STRAIN ADAPTED IN VERO CELL)

【도면의 간단한 설명】

도1은 본 발명에 따른 일본뇌염바이러스 CJ50003의 베로세포에서의 계대력을 나타낸 그래프이다.

도2는 본 발명에 따른 일본뇌염바이러스 CJ50003을 베로세포에서 배양 및 정제하여 제조한 백신의 단백질 성분을 폴리아크릴아마이드 전기영동법으로 확인한 사진이다. 여기서, MK는 사전에 염색된 단백질 크기 마커 (Novex)를 가리키며 각각의 크기는 위로부터 250, 98, 64, 50, 36, 30, 16, 6, 4kDa이다. 또한, 숫자 1-9는 초원심분리에 의한 바이러스 정제분획을 가리키며 숫자가 증가할 수록 튜브의 윗층 분획이다.

도3은 정제된 본 발명의 일본뇌염바이러스를 포르말린으로 처리하고 시간에 따른 바이러스 불활화 정도를 PFU값으로 조사한 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 일본뇌염바이러스를 배로세포에서 재배배양하여 작용시켜 일본뇌염백신의 제조에 탁월한 생산성 및 우수한 백신 효능을 나타내는 일본뇌염바이러스 변이주에 관한 것이다.

종래의 일본뇌염백신에 사용되었던 대표적인 일본뇌염바이러스로는 Nakayama, Beijing P1, P3바이러스주를 들 수 있으나, Nakayama 바이러스주는 산업적 이용을 위한 대량생산에 있어서, 동물 세포 배양시 생산성을 갖기에 충분한 양으로 배양되지 않으므로 마우스 배양을 통한 바이러스 항원의 생산은 안전성면에서 그 한계를 지남에도 불구하고 현재까지 마우스 뇌 배양을 통한 백신 생산이 이루어지고 있는 현황이다. 즉, Nakayama 바이러스를 사용하여 제조된 일본뇌염백신은 공정상 감염능을 제거하는 과정을 통해 신경독성(neurovirulence)을 제거하려 했음에도 불구하고 최근들어 국내에서 전신성 부작용으로 수명의 백신피접종자가 사망한 사례가 보고된 바 있다. 1954년 일본에서 개발되어 중국, 일본, 한국 등지에서 널리 사용되고 있는 비켄사(Biken, 일본)의 백신에 대한 부작용 사례가 국외에서 보고된 바 있다. 독일의 H.O. Nothdurst 등은 1989년 호주, 캐나다, 덴마크 등지에서 수명의 접종자가 두드러기(urticaria)나 혈관부종(angioedema)의 부작용 증세를 보였음을 증시하여 860명의 여행자에 대한 16개월간의 임상 관찰을 수행하였다. 여행

자 중 부작용 사례를 보인 275명을 증상으로 분류한 결과 약 55%는 집중주위가 붓거나(swelling) 과민증(tenderness)을 보였고 그외에 근육통(muscle ache), 두통(headache), 고열(fever malaise) 등의 증세를 나타냈다. 그리고 백신접종자의 65명(12.8%)이 발진(generalized rash) 증세를 포함하는 전신성 부작용(systemic side effect)을 보인다고 보고하고 있다(J. of infection 1996 :32,119-122).

이러한 전신 부작용으로 접종자가 극심한 면역부작용 증세인 과민 증세(anaphylactic reaction)를 일으킬 가능성을 배제할수 없다고 판단되어, 세포 배양을 통한 안전도 높은 일본뇌염백신 개발이 세계보건기구(World Health Organization: WHO)에 의해 철저히 요구되고 있다. 한편 Beijing P1 바이러스도 일본 비젠사에 의해 백신 생산균주로 사용되고 있으나, Nakayama 바이러스와 마찬가지로 대량 생산에 마우스뇌를 이용하고 있는 현황이다. 일부 중국에서는 Beijing P3 바이러스와 약독화 백신 균주로 사용되고 있는 SA14-14-2(PHK)를 초기 햄스터 신장(Primary Hamster Kidney, PHK) 세포에 배양하여 백신 생산에 사용하고 있다. 그러나, SA14-14-2(PHK)는 중국내에서만 1억 도스 이상 집중되고 있음에도 불구하고, 그 정제 공정이 WHO기준에 미치지 못하며, 생산세포주인 PHK가 WHO의 인간용 백신 생산 기준(Human Vaccine Standard)에 적합한 세포주로 평가되지 않는 한계로 인하여 중국내 국한되어 사용되고 있다.

【발명이 이루고자하는 기술적 과제】

본 발명자들은 기존의 마우스 뇌를 이용하지 않고, 인간에서 안전성이 검증된 세포에 적응되어 높은 생산성과 면역원성을 가지는 신규의 일본뇌염바이러스를 개발하고자 집중적인 연구를 수행한 결과, 배로세포에 일본뇌염바이러스를 계대배양하여 적응시켰을때 안전하고 효능이 뛰어난 일본뇌염백신의 제조에 적합한 일본뇌염바이러스 변이주를 얻을 수 있음을 발견하였다. 특정하여 예를 들면, 베로(Vero, ATCC CCL 81)세포주에서 일본뇌염바이러스 SA14-14-2(PCK)의 계대배양을 수행하고 계대배양별 선별 과정을 거쳐 베로 세포주에서 생산 가능한 CJ50003 바이러스주를 발명하였다.

【발명의 구성 및 작용】

본 발명은 배로세포주에 계대배양하여 적응시킨 일본뇌염바이러스 변이주를 제공한다.

특정적으로는, 본 발명은 일본뇌염 백신의 제조에 사용하는 경우에 있어서 탁월한 생산성 및 우수한 백신 효능을 나타내는 신규의 일본뇌염 바이러스 CJ50003을 제공한다.

본원에서는 본 발명을 대표하여 일본뇌염바이러스 CJ50003 변이주에 관하여 기술할 것이다.

본 발명에서 원형 바이러스로 사용된 일본뇌염 바이러스는 미국육군연구소 (Walter Reed Army Institute of Research: WRAIR) 에서 분리한 SA14-14-2 (PCK)바이러스주이다. SA14-14-2(PCK)바이러스는 모기에서 분리된 SA14 바이러스 독성주를 초기 햄스터 신장 (Primary Hamster Kidney: PHK) 세포에서 연속 계대를 행하여 분리된 바 있는 SA14-14-2(PHK)바이러스 약독화주를 개의 신장세포(Primary Canine Kidney: PCK)에 적응시켜 분리되었다(Vaccine 1988; 6, 513-518).

이 바이러스는 Flaviviridae에 속하는 바이러스의 하나이며 유전자가 단일 나선(single-stranded)의 양성 RNA 게놈(positive-sense RNA genome)으로서, RNA의 5' 말단은 메틸화(methylation)되어 있고, 3' 말단은 poly A 구조가 없는 것으로 알려져 있다. RNA 게놈은 약 11 Kb의 크기로 뉴클레오타이드 단백질 (C: 13,500 Da)과 결합된 상태로 존재하는 물리화학적 특성을 지닌다. 또한 상기바이러스에는 막단백질 (M: 8,700Da)과 외피단백질 (E: 53,000Da)이 포함되어 있으며 비구조단백질로는 NS1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, 5 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다.

본 발명의 CJ50003바이러스는 일본뇌염바이러스인 SA14-14-2(PCK)바이러스를 배로 세포주에서 계대 배양하면서 배로 세포중에 형성된 포커스(Focus) 수로 바이러스 증식 상황을 관찰하여 선별된 것으로서 배로 세포주에서의 바이러스 역가가 1×10^7 PFU/ml(Plaque Forming Unit/ml) 이상인 바이러스로 백신 생산에 매우 적합한 성질을 갖는 바이러스이다. 한편, 배로 세포주에의 계대과정 별로 바이러스주

를 어린 마우스의 뇌내에 주사하여 마우스 치사를 살펴 보았을 때 마우스 치사를 전혀 초래하지 않는 것으로 나타났다. 이는 배로 세포주에 적응된 바이러스가 약독 화주로서 매우 안정된 백신균주임을 입증한다.

또한, CJ50003바이러스는 배로 세포주에서 증식하여 정제과정을 거친 백신 으로 제조하여 백신제품 효능성을 조사하기 위해 플라크 감소 중화 시험법으로 실험한 결과, 본 발명의 바이러스로 제조된 백신이 비교 백신(제일제당 일본뇌염백신, 제조번호: 5201)과 비교해서 동등 이상의 중화 능력을 나타냄을 확인하였다.

본 발명에서는 또한 원형바이러스인 SA14-14-2(PCK) 바이러스에 비해 우수한 생산성과 면역원성을 지니는 본 발명의 목적 바이러스 CJ50003이 어떤 물리화학적 특성에 의해 이러한 성질을 나타내는지를 확인하기 위하여 바이러스게놈을 PCR 방법으로 증폭시키고 pGEM-T벡터에 클로닝한 다음 염기 서열을 결정한 결과, 원형의 SA14-14-2(PCK) 바이러스와 달리 CJ50003은 바이러스의 외피 유전자의 염기 서열 1,506번째 아데닌, 1704번째 아데닌, 1,769번째 구아닌이 각각 구아닌, 구아닌, 티민으로 치환되어 있으며, 그에 따라 그 유전 정보에 상응하는 아미노산 서열 177번째 트레오닌, 243번째 라이신, 264번째 글루타민이 각각 알라닌, 글루타민산, 히스티딘으로 변환되어 있음을 알 수 있었다.

따라서, 이와 같은 변환을 통하여 기존에 존재하던 바이러스에 비해 세포배

양을 통한 백신제조에 있어 탁월한 생산성과 백신효능을 나타내게 되었다고 생각되며, 이러한 결과는 앞으로 일본뇌염을 퇴치함에 있어 인류 사회에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

【실시예】

【실시예 1】

일본뇌염바이러스 CJ50003의 제조

CJ50003의 제조에 사용된 원형바이러스 SA14-14-2(PCK)는 미육군 연구소에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 SA14-14-2(PCK)를 배로 세포에 감염시켜 계대배양을 연속적으로 수행하여 동물세포 배양에 적응시키는 과정을 수행하였다.

먼저, 분양받은 SA14-14-2(PCK)바이러스주를 다음에 기술하는 플라크 검정을 통해 플라크형성인자수(Plaque Forming Unit, PFU)를 계산하였다.

1) 배로 세포를 T80 세포배양 플라스크에서 아래의 조성을 가진 성장배지를 이용하

여 통상의 세포배양 방법으로 배양하였다. 배로 세포의 계대시에는 1:4의 비율로 증식이 되도록 접종하며, 계대후 4일이 지나면 플라스크 바닥면에 배로 세포가 포화상태로 자라게 되는데, 이때 배로세포를 플라스크 겉면에 사용하였다. 배로 세포의 배양에 사용하는 성장배지의 조성은 다음과 같다:

이글염을 함유한 최소필수배지(EMEM)	9.4g/L
소테아혈청	10 %
중탄산나트륨	2.25g/L
페니실린	100 U/ml
스트렙토마이신	100 U/ml
글루타민	2 mM

2) 트립신을 이용하여 T80 플라스크에서 포화상태로 자란 배로세포를 분리하고 이를 성장배지 50ml에 현탁하였다. 이때의 세포수는 5×10^6 /ml에서 1×10^6 /ml 정도가 된다. 이렇게 만든 현탁액을 24공 세포배양 플레이트에 1 ml씩 접종하여 1일간 배양하여 단층을 이루도록 하였다.

3) 플라크형성인자수(Plaque Forming Unit, PFU)를 구하려는 바이러스액을 성장배지를 이용하여 10배씩 단계희석하고 이를 성장배지를 이용하여 다시 1:1로 희석하였다.

4) 위의 2)에서 단층배양된 플레이트의 배지를 제거하고 위의 3)에서 만든 단계 회색액을 0.2ml씩 접종하고 37°C 세포배양기에서 2시간동안 배양하였다.

5) 배양이 끝난후 4)의 단계회색액을 완전히 제거한후 중층배지를 1ml씩 넣었다. 중층배지의 구성은 다음과 같다:

메틸실로로즈(2%)	80ml
소태아열청	10ml
글루타민(0.2M)	2ml
중탄산나트륨(7.5%)	6ml
페니실린/스트렙토마이신(10,000U/ml)	2ml
히피스완충액(1M)	2ml
이글염을 함유한 최소 필수 배지(2X)	100ml

6) 플레이트를 37°C 동물세포 배양기에서 이산화탄소 농도를 5%로 유지하면서 7일간 정치 배양하였다.

7) 플레이트에서 중층배지를 제거한후 염색액을 0.5ml씩 첨가하여 15-30분간 반응시켰다. 이때의 염색액의 조성은 다음과 같다:

에탄올	200ml
크리스탈 바이올렛	10g
포르말린(37%)	50ml
염수(0.8%)	750ml

8) 염색이 끝난후 염색액을 버리고 수돗물을 이용하여 플레이트를 5회이상 씻어 주었다.

9) 라이트박스 위에서 플레이트에 나타난 플라크수를 세어 다음식에 의하여 플라크형성인자수를 계산하였다:

$$\text{플라크형성인자수} = \text{플레이트상의 플라크수} \times \text{희석배수} \times 10$$

상기에 언급한 바와 같이 플라크검정을 통해 플라크형성인자수(Plaque Forming Unit, PFU)를 계산한 바이러스주를 배로세포수 : 바이러스수 = 1 : 0.2 의 비율이 되도록 감염시켜 37 °C 동물세포 배양기에서 배양하였다. 배양후 3일째에 배양을 취하여 원심분리를 행하고(2,000rpm, 10min) 이층 상층액을 취하여 바이러스 계대배양액을 제조하였다. 이렇게 얻어진 바이러스 계대배양액에서 아가로스 고체배지를 이용하여 10개 이상의 단일 플라크를 분리하고, 이를 다시 배로세포 배양

을 통해 증폭한 다음 각각에 대하여 플라크형성단위수(Plaque Forming Unit, PFU)를 재었다. 이렇게 하여 역가가 가장 높은 바이러스를 선별하고 위에서 서술한 방법으로 감염과 배양 그리고 분리선별 과정을 반복 수행하여 15세대 배양을 완료하였다.

각 계대별로 역가가 가장 높은 바이러스 플라크를 선별하여 배로 세포에서 증폭배양한 바이러스의 플라크형성단위수(Plaque Forming Unit, PFU)는 표 1과 같으며 이를 그래프로 나타낸 것이 도1이다.

【표 1】

배로 세포에서의 계대별 바이러스 역가

계대수	바이러스역가(PFU/ml)	계대수	바이러스역가(PFU/ml)
SA14-14-2(PCK)	3.8×10^6	8	3.4×10^7
1	4.2×10^6	9	3.7×10^7
2	4.9×10^6	10	3.3×10^7
3	6.8×10^6	11	3.6×10^7
4	3.2×10^7	12	3.5×10^7
5	3.4×10^7	13	3.5×10^7
6	3.2×10^7	14	3.3×10^7
7	3.2×10^7	15	3.8×10^7

이와 같이 SA-14-14-2(PCK)를 배로 세포에 배양한 결과 4세대부터 15세대에 이르는 동안 바이러스의 역가가 1×10^7 이상으로 안정되게 유지되었으며 이는 SA-14-14-2(PCK) 바이러스가 배로 세포에 완전하게 적응된 것임을 의미한다. SA-14-14-2(PCK)의 바이러스 역가가 3.8×10^6 PFU/ml인데 말하여 배로 세포에 적응된 후에는 1×10^7 PFU/ml을 훨씬 초과하여 높은 역가를 나타냈다.

【실시예 2】

일본뇌염바이러스 CJ50003에 의한 포유마우스의 치사율(LD₅₀)

(가) 포유마우스 대뇌에서의 CJ50003의 증식

5주령의 ICR마우스 대뇌에 1.7×10^7 PFU/ml의 CJ50003 바이러스주를 30ul 씩 종하고 10일동안 사육하면서 하루에 5마리씩 희생하여 경부원관 제거후 뇌를 채취하였다. 여기에 뇌중량의 4배량에 해당하는 EMEM 배지를 넣고 현탁시킨후 한의 마쇄기로 속도 7도에서 매회 30초간, 10초의 간격을 두고 6회의 분쇄과정을 수행하였다. 분쇄된 용액을 5000rpm으로 60분간 원심분리하여 그 상층액을 취하고 0.2um 필터를 이용하여 여과시킨후 여과액에 대하여 앞에서 설명한 플라크 검정으로 바이러스의 역가를 측정하였다. 그 결과는 다음의 표2에 나타낸것과 같다.

【표 2】

포유마우스 대뇌에서의 CJ50003의 역가변화

날짜	바이러스 역가(PFU/ml)
1	7.5×10^3
2	4.7×10^3
3	1.1×10^4
4	1.2×10^4
5	8.0×10^3
6	4.0×10^3
7	3.7×10^2
8	1.5×10^1
9	6.0×10^0
10	2.0×10^0

표 2. 에서 보는바와 같이 CJ50003 바이러스는 5주령 마우스 뇌에서 10일정도 지나면 거의 소멸되는 것을 알 수 있다. 이는 상기의 바이러스가 약독화되어 있음을 나타낸다.

(나) CJ50003에 의한 포유마우스의 치사율(LD₅₀)

CJ50003에 의한 치사율(LD₅₀)을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 행하였다. 먼저 1×10^7 PFU의 역가를 나타내는 CJ50003 바이러스를 단계별로 10배씩 희석

하고 회석된 바이러스 30ul씩을 생후 1일이 지난 영아 포유마우스의 대뇌에 접종하였다. 접종후 25일간 관찰하여 사망하는 마우스의 수를 기록하였으며 사망한 마우스 수가 접종한 마우스 수의 1/2이 되는 회석액 농도를 구하여 리드옐드 원히법 (Reed and Munch Method)으로 바이러스에 의한 마우스의 치사율을 계산하였다. 그 결과는 다음의 표 3. 에 나타난 바와 같다.

【표 3】

CJ50003에 의한 포유마우스의 치사율(LD₅₀)

바이러스 회석배수	접종수	폐사수	생존수	누적사망수	누적생존수	누적치사율
10 ⁰	20	9	11	12	11	0.52
10 ¹	20	2	18	3	29	0.09
10 ²	20	1	13	1	48	0.02
10 ³	20	0	20	0	68	0.00
10 ⁴	20	0	20	0	88	0.00
10 ⁵	20	0	20	0	108	0.00
10 ⁶	20	0	20	0	128	0.00
10 ⁷	20	0	20	0	148	0.00
10 ⁸	20	0	20	0	168	0.00
10 ⁹	20	0	20	0	188	0.00

상기표로부터 50% end point = $10^{-0.047}$

LD₅₀ = 2.7×10^5 PFU

상기 방법에 따라 계산된 CJ50003 바이러스에 의한 치사율(LD₅₀)은 2.7×10^5 PFU로서 원형바이러스인 SA14-14-2(PCK)의 치사율인 2.0×10^5 PFU(Vaccine,

Vol. 6, December, 1988, pp 513-518)에 비해 약독화가 더욱 진행된 것을 알 수 있으며, 백신 생산에 직접 응용될 수 있는 배로 세포에서 배양할 수 있는 성질을 가지게 되었으므로 본 발명의 CJ50003 바이러스는 백신 생산에 매우 적절하게 변형되었음을 의미한다.

【실시예 3】

일본뇌염바이러스 CJ50003의 유전자 염기서열 조사

CJ50003 바이러스는 원형바이러스와 달리 배로 세포주에 완전 적응되어 동물 세포 배양에 의한 바이러스의 생산이 가능하게 되었다. 따라서 CJ50003 바이러스가 원형바이러스 SA14-14-2(PCK)에 비해 유전자의 어느 부위가 변이되어 이러한 결과를 나타내는 것인지 알아보기 위하여 바이러스의 물리화학적 특성 연구를 수행하였다.

배로 세포에 적응된 바이러스의 외피 유전자 클로닝 및 염기 서열 분석을 위해 배로 세포에 4계대 배양한 바이러스에 대하여 플라크를 순수분리하여 이를 다시 배로 세포에서 배양하여 증폭하였고, 배양상층액으로부터 구아니딘 이소시안산염 방법으로 RNA를 정제하였다. 정제된 RNA를 일본 뇌염바이러스 표면 항원의 유전자 서열에 특이한 프라이머를 이용해 역전사-중합 연쇄 반응하여 바이러스 외피유전자 cDNA를 증폭 하였다. 중합연쇄반응에 사용한 두 종류(P1: 염기위치 949-969; P2:

염기위치 2471-2500)의 프라이머 염기 서열은 다음과 같다:

P1: 5'-CGCGGATCCTCTGCTGTTGGTCGCTCCGG-3'.

P2: 5'-GAAGATCTATGTCAATGGCACATCCAGTGTGAGCATGC-3'.

증폭된 바이러스의 외피 유전자를 pGEM-T(Promega) 운반체에 클로닝하고 이의 유전자 염기서열을 조사하였다. 세로이 분리된 바이러스의 염기서열은 이의 원형 바이러스인 SA-14-14-2(PCK)의 염기서열(Nitayaphan et al. Virology 177, pp541-552, 1990)과 비교했을 때 다음과 같이 변화 되었음을 발견하였다:

염기

아테닌(1,506), 아테닌(1,704), 구아닌(1,769)--->구아닌. 구아닌, 티민

아미노산

트레오닌(177), 라이신(243), 글루타민(264)--->알라닌. 글루타민산. 히스티딘

위와 같이 SA-14-14-2(PCK)를 배로 세포에 15계대이상 배양하면서 플라크를 순수분리하여 원형바이러스 SA-14-14-2(PCK)과 유전적 형질이 바뀐 새로운 바이러스주를 얻었고 이 바이러스주는 배로 세포에서 배양을 다시 행하였을때 바이러스의 플라크형성인자수(Plaque Forming Unit, PFU)가 1×10^7 /ml 이상 유지되는 특성을 가

지고 있었다. 따라서 본 발명자들은 이 새로운 바이러스주를 CJ50003으로 명명하고 이를 1997년 8월 16일로 유전자 은행에 기탁하였다. (기탁번호: KFCC10982)

【실시예4】

일본뇌염바이러스 CJ50003를 이용한 백신의 제조

(가) 배로세포에서 CJ50003 바이러스의 배양

플라크검정을 통해 플라크형성인자수(Plaque Forming Unit, PFU)를 계산한 바이러스주를 배로세포수 : 바이러스수 = 1 : 0.2 의 비율이 되도록 감염시켜 37 °C 동물세포배양기에서 배양하였다. 배양에 사용된 배지의 조성은 다음과 같다:

이글염을 함유한 최소 필수 배지(EMEM)	9.4g/L
소태아혈청	10 %
중탄산나트륨	2.25g/L
페니실린	100 U/ml
스트렙토마이신	100 U/ml
글루타민	2 mM

집중후 후 3일에서 10일간 바이러스가 성장한 배양액을 모아 하기의 (나)공정에 의거하여 바이러스를 정제하였다.

(나) 폴리에틸렌글라이콜 8,000(PEG 8,000)법 또는 한외여과법을 이용한 바이러스 정제

배로 세포에 접종하여 배양한 바이러스액을 4℃, 6,000g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상기의 바이러스 상층액을 1차 정제하기위해 폴리에틸렌글라이콜 8,000 또는 한외여과를 수행하였다. 전자의 경우에는 바이러스 상층액에 폴리에틸렌글라이콜 8,000을 10%, NaCl 22.2g/L의 농도로 첨가하여 4℃에서 2시간동안 교반하여 녹였다. 교반이 끝난 용액을 4℃, 13,000g에서 30분간 원심분리하여 상등액은 버리고 바이러스 침전물을 얻었다. 여기에 4℃의 STE (Tris 10mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, pH 7.5) 버퍼를 넣고 완전히 현탁시켰다. 이를 '바이러스농축액1'이라 명명하였다. 한외여과의 경우에는 Filtron사의 Ultrasette™ 필터를 사용하였는데, 기공 크기는 300kDa인 것을 사용하였다. 필터는 사용 하루 전에 세척/살균한 후 사용하였고, 바이러스 상층액이 250ml(±25ml)의 부피로 출폐까지 농축/투석을 계속하였다. 상기의 액을 '바이러스농축액2'라 명명하였다. '바이러스농축액1' 또는 '바이러스농축액2'에 프로타민 설페이트를 2mg/ml 넣고 4℃에서 2시간동안 반응시켰다.

반응이 끝난 용액을 4℃, 10,000g에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 얻고 이를 '1차 바이러스 정제액'이라 명명하였다.

(다) 수크로우스를 이용한 초원심 분리

위의 (나)항에서 얻은 '1차 바이러스 정제액'을 초원심분리를 행하여 바이러스 항원물질을 보다 순도 높게 정제하고자 하였다. 메칸 초원심분리기와 수크로우스 15 - 60 %가 연속적으로 장치된 SW28 로터를 이용하였으며 상층에는 (나)공정에서 얻어진 바이러스액을 배치하였다. 초원심분리는 4°C, 38,000g에서 18시간동안 행하였다. 초원심분리를 마친후 분획을 받아 254nm에서 흡광도를 재어 바이러스가 함유된 분획만을 취하였다. 이렇게 정제된 바이러스액에 대하여 폴리아크릴아마이드 전기영동을 통해 단백질 성분을 조사한 결과 일본뇌염바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질(C: 13,500 Da), 막단백질(M: 8,700Da), 외피 단백질(E: 53,000Da)이 모두 순도 높게 정제되었음을 확인하였다(도2). 수득된 바이러스 정제액의 단백질 함량을 브레드포드 검정을 시행하여 측정하고, PBS로 희석하여 수크로우스 농도가 10% 이하가 되게 조정한 다음 기공 크기가 0.22 μ m인 필터를 이용하여 여과한 후 바로 (라)의 불활화 공정을 수행하거나, 충분한 부피의 인산완충액으로 투석한 다음, 기공 크기가 0.22 μ m인 필터를 통과시켜 (마) 공정을 시행하였다.

(라) 불활화 공정

위의 (다)공정에서 얻은 바이러스 정제액에 포르말린을 0.018%가 되게 처리

하여 22°C 항온물욕조에 정치하여 7일간 불활화 과정을 수행하고 NaHSO_3 를 0.038% 첨가하였다. 위의 바이러스 불활화액을 충분한 부피의 인산완충액으로 투석한 다음, 기공 크기가 0.22 μm 인 필터를 통과한 후 계속해서 (마) 공정을 수행하였다. (마) 공정 전에 바이러스가 완전히 불활화됐는지 조사하기 위해, 불활화 공정중 일정한시간마다 샘플링을 하여 플라크 검정을 행하여 불활화 여부를 확인하였다(153). 이 결과 포르말린 처리후 7일이 지나면 바이러스는 완전히 불활화되어 감염능을 상실하는 것으로 나타났다. 그리고 불활화 공정을 마친 바이러스를 다시 배로 세포주에 감염시켜 1차 증폭하고, 다시 증폭된 바이러스에 대하여 플라크 검정을 행한 결과에서도 잔존 바이러스는 전혀 검출되지 않아 불활화가 완전히 진행되었음을 확인하였다.

(마) 첨가제 처리

위의 (다) 또는 (라)공정에서 얻은 바이러스 정제 원액의 바이러스 단백질 함량을 조사하여 바이러스가 10 μg , 5 μg 이 되게 시험백신을 제조하였으며 이때 정제 젤라틴 0.02%(W/V), EDTA 0.004%(W/V), 벤질알콜 0.3%(V/V), 그리고 치메로살 0.01%(W/V)가 함유되도록 하였으며 각각의 시험백신의 부피는 1ml이 되도록 하였다. (다) 공정 후, (라)의 불활화 공정을 거쳐, (마) 공정을 수행하여 제조한 백신은 불활화 백신으로 '시험백신1'이라 명명하고, (다) 공정 후, (라)의 불활화 공정을 거치지 않고, (마) 공정을 수행하여 제조한 백신은 약독화 생백신으로 '시험백

신2'라 명명하고 다음 실험으로 진행하였다.

【발명의 효과】

【실시예 5】

일본뇌염바이러스 CJ50003으로 제조된 시험백신의 효능성 연구

CJ50003 바이러스가 백신 제조에 사용되기에 적합한지 여부를 확인하기 위하여 백신효능성을 조사하였다. CJ50003을 배로 세포주 조직배양을 이용하여 바이러스를 증식시킴에 있어서 바이러스 원액으로부터 1ml의 1×10^7 플라크형성인자수 (Plaque Forming Unit)를 꺼내어, 성장배지 EMEM으로 희석하고, 희석된 바이러스용액을 포화 상태로 자란 배로 세포주에 접종함으로써 수행하였다. 접종한 후 바이러스가 성장한 배양액을 모아 바이러스를 정제하였다. CJ50003 바이러스 함유 배양액의 1차 정제에는 일본뇌염 바이러스 특성에 맞추어 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 8,000법 또는 한외여과를 시행하였고, 계속적으로 프로타민 설페이트 처리법을 적용하였다.

상기의 방법은 통상의 지식을 가진 자가 실시할 수 있는 것으로 한외여과는 필터 기공 크기가 300kDa 보다 작은 것을 사용하여 시행하였고, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 8,000법은 PEG8,000을 사용하여 바이러스를 침전시켜 농축하는 방법이다. 상기의 바이러스를 2차 정제하는 방법으로 통상의 지식을 가진 자가 실시하는 것으

로서, 연속 수크로스 농도구배(continuous sucrose gradient)나 다중 수크로스 농도구배(multi-step sucrose gradient) 초원심분리를 사용하여 정제 과정을 계속적으로 수행하였다. 분획화를 위한 수크로우스 쿠션으로는 15-60% 수크로우스 용액 15ml를 연속적으로 베르만 SW28 튜브에 장치한 것을 사용하며 상기의 바이러스 농축용액을 쿠션 위에 장치하였다. 수크로우스를 이용하는 초원심분리는 4°C 에서 17,000 rpm으로 18시간 이상 수행함이 바람직하며 바닥층 아래에 구멍을 뚫고 분획을 받아 정제하였다.

위와 같이 정제된 바이러스 용액을 백신 제조에 이용하기 위해서는 불활화 공정을 거쳐, 불활화 백신을 제조하거나, 바로 투석 및 필터 과정을 거쳐 약독화 생백신을 제조하는 2가지 방법을 사용할 수 있는데 불활화 공정은 상기에서 얻어진 정제 상층액을 포르말린 희석액으로 처리함으로써 수행하였다. 불활화 시킨 용액은 중화, 필터 과정과 투석을 통하여 최종적으로 정제하였다. 상기의 정제 공정을 마친 바이러스 용액은 브래드포드 단백질 정량법 및 혈구 응집 방법을 통하여 바이러스의 양을 측정한후 시험 백신용으로 사용하였다. 시험백신은 정제 젤라틴 0.02%(W/V), EDTA 0.004%(W/V), 벤질알콜 0.3%(V/V), 그리고 치메로살 0.01%(W/V) 가 함유되도록 하였으며 각각의 시험백신의 부피는 1ml가 되도록 하였다. CJ50003 바이러스로 제조된 시험백신의 유효성을 조사하기 위해 마우스를 대상으로 실험하였으며, 비교백신으로는 현재 시중에 유통, 판매되고 있는 일본뇌염백신(제조원: 제일제당, 제조번호: 5201)을 이용하였다. 그리고 대조군으로는 인산원충액만을 주

사하였다. 한편 시험백신의 바이러스의 함유량은 10ug/ml, 5ug/ml로 사용하였다. 마우스는 4주령의 Balb/C를 이용하였으며 1주 간격으로 2회 복강주사를 행하였다. 2번째 주사후 1주가 지난 다음 심장 채혈하여 혈장만을 분리한 후 56℃에서 30분간 열처리후 아래의 플라크감소중화시험법(Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT)를 이용하여 백신의 유효성을 판정하였다.

1) 채취된 혈청을 1:10배 희석부터 시작하여 2배씩 단계 희석하여 10.240배 희석액까지 만들었다. 이때 희석액으로는 EMEM 배지를 이용하였다.

2) 희석시킨 혈청 300ul와 500-1,000 PFU/ml가 되게 제조한 공격용 바이러스액(Nakayama주) 300ul를 24공 플레이트에 넣어 잘 혼합한후 37℃에서 90분간 중화시켰다. 한편 전체 플라크수는 공격용 바이러스액 300ul와 EMEM배지 300ul를 섞어 감염시켜 산정하였다.

3) 24공 세포배양 플레이트에서 단층배양한 배로 세포에서 배지를 완전히 제거한 다음 상기 혼합액을 0.2ml씩 분주한 다음 37℃ 동물세포 배양기에서 90분간 반응시켜 바이러스를 배로 세포에 감염시켰다.

4) 위의 접종액을 제거하고 플레이트의 각 공에 중층배지를 1ml씩 분주하여 동물세포배양기에서 5% 농도의 이산화탄소, 온도는 37℃를 유지하면서 6일간 정치배양하였

다. 이때 사용한 중증배지의 조성은 실시예1의 플라크 검정에서 사용한 것과 같은 조성의 것을 사용하였다.

5) 위 4)항에서 6일간의 배양을 마친 후 중증배지를 완전히 제거하고 염색액을 각 공당 0.5ml씩 가하여 플라크 수를 관찰하고 전체 플라크 수와 비교하여 PRNT값이 50%이상 줄어든 혈청 회석배수의 역수값을 각 혈청의 PRNT 값으로 정하였다. 한편 이때 사용한 염색액의 조성은 실시예 1의 플라크 검정에서 사용한 것과 같은 조성의 것을 사용하였다.

상기의 방법으로 실험한 결과 표 4와 같은 결과를 얻었다.

【표 4】

CJ50003으로 제조한 시험백신의 중화역가 비교

항 혈 청	PRNT값(50%감소)
대조군(인산완충액)	10
비교백신(80mg이하)	320
시험백신1 (5ug)	320
시험백신1 (10ug)	320
시험백신2 (5ug)	320
시험백신2 (10ug)	640

표 4에서 알 수 있는 바와 같이 바이러스 CJ50003로 제조한 시험백신은 5ug

의 항원량으로 비교백신과 동등의 중화역가를 보이고 있다. 또한 '시험백신2'는 10ug의 항원량으로 비교백신보다 2배의 중화역가를 보였다. 그러므로, 신규한 CJ50003바이러스로 제조한 본 발명의 백신은 배로 세포배양에 의해 생산할 수 있게 되어, 생쥐의 뇌에서 생산되는 기존의 일본뇌염백신과 비교할 때 안전성면에서 매우 뛰어난 백신일 뿐만 아니라 백신 효능 면에서도 기존 백신과 비교했을 때, 동등 이상의 역가를 갖는 것으로 판명되었다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

배로 세포주에 계대배양하여 획득시킨 일본뇌염바이러스.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 계대별로 바이러스를 단일 플라크로 분리하여 증폭하고, 이중 역가가 높은 바이러스 플라크를 선별하는 방법에 의해 제조된 일본뇌염바이러스.

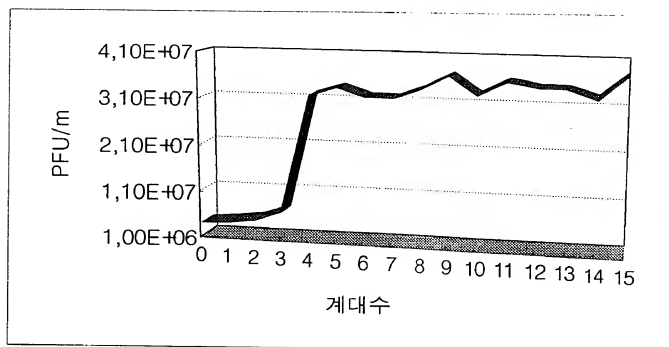
【청구항 3】

제1항에 있어서, 바이러스 역가가 1×10^7 PFU/ml 이상이고, LD50가 2.7×10^5 PFU이상인 일본뇌염바이러스.

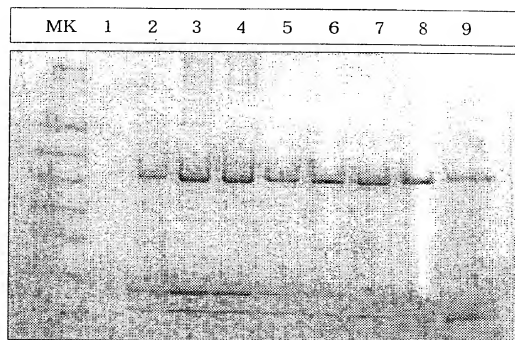
【청구항 4】

제1항에 있어서, CJ50003 (기탁번호: KFCC10982)인 일본뇌염바이러스.

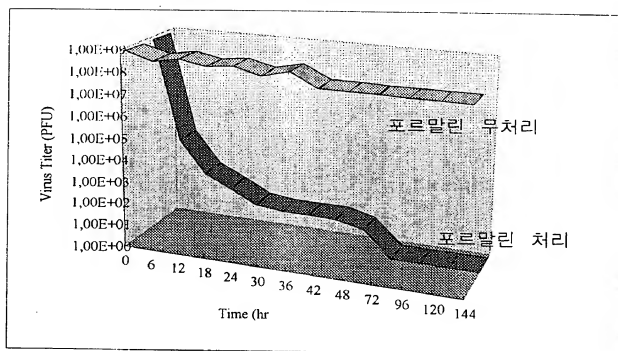
【도 1】



【도 2】



【도 3】





(별지 제 4호 서식)

미생물 수탁 번호 통지서

제 97- 38호

1997 년 8월 6일 제97-38호로 귀하가 보관 기탁 신청한
미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 수탁번호를 통지합니다.

— 다

음 —

1. 미생물의 명칭 : CJ50003
2. 미생물 수탁번호 : KFCC - 10982

1997 년 8월 16일

사단법인 한국중균협회장



제일제당(주) 귀하



위 임 장

수 임 자	성 명	최 학 현	대리인코드	700 - L137	전화번호	365 - 6251
	성 명	황 주 명		379 - S055		365 - 6251
자	주 소	서울특별시 서대문구 충정로 3가 222 (120-013)				

사 의 표 시	특허출원				

발 명 의 명 칭	세포배양에 적용된 일본뇌염바이러스				
-----------	--------------------	--	--	--	--

위 임 자	성 명	제일제당 주식회사 대표이사: 손 경 식			
	주 소	서울특별시 중구 남대문로5가 500번지			
	사건과의 관계	출원서			

위 임 할 사 항	가) 상기 특허 출원에 관한 일체의 행위와, 상기 출원에 관한 심사청구, 출원변경, 출원분할, 증명의 청구, 취하, 포기, 출원인명의변경, 주소의 변경, 이의신청 및 이의답변을 할 권한과, 상기 출원의 거절사정 및 보정각하결정에 대하여 불복항고심판을 청구할 권한과, 상기 출원에 대한 행정처분에 불복하는 소원 및 소송을 제기하는 권한과, 상기 출원, 항고 심판 및 소송에 관하여 제출한 서류, 물건의 반환을 받을 권한.				
	나) 전기 사항을 처리하기 위한 복대리인의 선임 및 해임에 관한 권한.				

특허법 제7조, 실용신안법 제3조, 의장법 제4조 및 상표법 제5조의 규정에 의하여 위와 같이 위임함.



1997년 8월 27일

위임자: 제일제당 주식회사
대표이사: 손 경 식

